

ACTA DE LA REUNIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE LA FACULTAD DE FARMACIA, CELEBRADA EL DÍA 18 DE MARZO DE 2015

En la Sala de Juntas “Blanca Feijoo” de la Facultad de Farmacia, siendo las **13:30 horas** del día **18 DE MARZO DE 2015** se reúne el Comité de Ética y Experimentación Animal de la Facultad, previamente convocado al efecto, bajo la presidencia del Ilmo. Sr. Decano, Profesor Dr. D. Rafael Lozano Fernández, actuando como Secretario el Prof. Dr. D. Jesús Román Zaragoza.

El **Orden del Día** es el siguiente:

- 1. Lectura y aprobación, si procede, del Acta de la Comisión celebrada el pasado 19 de diciembre de 2014.**
- 2. Propuesta de Proyecto de la Sección Departamental de Fisiología Animal (Se adjunta documentación).**
- 3. Ruegos y preguntas**

ASISTENTES

Prof. Dr. D. Rafael Lozano Fernández
Prof. Dr. D. Jesús Román Zaragoza
Prof^a. Dra. D^a. Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado
Prof^a. Dra. D^a. Juana Benedí González
Prof^a. Dra. D^a. Concepción Gil García
Prof^a. Dra. D^a. M^a. Pilar Iniesta Serrano
Prof^a. Dra. D^a. Ana M^a. López Sobaler
Prof. Dr. D. Albino García Sacristán

- 1. Lectura y aprobación, si procede, del Acta de la Comisión celebrada el pasado 19 de diciembre de 2014.**

Se aprueba el acta por asentimiento.

- 2. Propuesta de Proyecto de la Sección Departamental de Fisiología Animal (Se adjunta documentación).**

Una vez estudiada la documentación, previamente enviada a los miembros de la Comisión, aportada por el Prof. Dr. Medardo Vicente Hernández Rodríguez, de la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia, Investigador Principal del Proyecto de Investigación: *“Deterioro de la funcionalidad de la vejiga urinaria en un modelo experimental*

de obesidad resistente a la insulina” presentado como Proyecto de Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-FIS) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) en la convocatoria del BOE 3-3-2015 (PR11/15):

Se decide informar favorablemente que dicho Proyecto de Investigación pueda ser llevado a cabo en las instalaciones del Estabulario de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la UCM con nº de registro ES-28079-0000085, ya que cumple los requisitos deontológicos y éticos para el uso de mantenimiento y cría de roedores según el Real Decreto RD 53/2013 de 1 de febrero de 2013.

3. Ruegos y preguntas.

No ha lugar.

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión siendo las 14:00 horas del día de la fecha de cuyo contenido, que recoge la presente acta, como Secretario, doy fe.

Madrid, 18 de marzo de 2015
EL SECRETARIO ACADÉMICO

Fdo.: Jesús Román Zaragoza

TÍTULO: "Deterioro de la funcionalidad de la vejiga urinaria en un modelo experimental de obesidad resistente a la insulina".

Investigador principal: Dr. Medardo Vicente Hernández Rodríguez

Resumen (Objetivos y metodología):

(Máximo 250 palabras)

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de trastornos metabólicos y/o factores de riesgo de enfermedad cardiovascular interrelacionados, como son la obesidad central, la diabetes mellitus tipo II (DMII), la dislipidemia y la hipertensión que tienen como común denominador la resistencia a la insulina, una hiperinsulinemia compensadora y una intolerancia a la glucosa. Tanto el SM como la DMII son conocidos factores de riesgo del denominado cuadro sintomatológico del Tracto Urinario Inferior y de la vejiga hiperactiva. Con el envejecimiento el riesgo de padecer diabetes y enfermedad cardiovascular se incrementa considerablemente junto con episodios de incontinencia urinaria (IU) asociados con la obesidad. Así, individuos obesos de ambos sexos presentan una mayor incidencia de episodios de IU de urgencia producidos por hiperactividad del músculo detrusor. A pesar de que tanto la obesidad como la diabetes son factores de riesgo de IU existe una escasa información sobre los mecanismos fisiopatológicos neurovegetativos responsables de la disfuncionalidad vesical característica en pacientes con SM. Por ello, el objeto del presente estudio es investigar, mediante diferentes abordajes experimentales (inmunohistoquímica, *Western blot*, registro de fuerza isométrica y medida simultánea de $[Ca^{2+}]$ y tensión), las modificaciones en la expresión y funcionalidad de los receptores de cannabinoides, las sintasas de óxido nítrico y las ciclooxigenasas en el detrusor de la rata Zucker obesa, modelo experimental de SM similar al producido en el hombre, en aras a posibilitar la elección de terapias farmacológicas efectivas en la clínica urológica asociada al SM.

TITLE: "Impairment of the urinary bladder function in an experimental model of insulin-resistant obesity".

Summary (Objectives and methodology):

Metabolic syndrome (MS) is a cluster of metabolic disorders and/or risk factors of cardiovascular disease, including central obesity, type II mellitus diabetes (DMII), dyslipidemia and hypertension which share a common insulin resistance, a compensatory hyperinsulinemia and a glucose intolerance. Both the MS and the DMII are known risk factors for lower urinary tract symptoms and overactive bladder. With aging the risk of diabetes and cardiovascular disease increase the presence of urinary incontinence (UI) associated with obesity. In fact, obese individuals have a higher incidence of urgency UI produced by detrusor overactivity. Although both obesity and diabetes are risk factors for UI, there is little information on the autonomic pathophysiological mechanisms responsible for bladder motor dysfunction in MS. Therefore, the aim of the current study is to investigate, using different experimental approaches (immunohistochemistry, *Western blot*, isometric force recordings and simultaneous measurement of $[Ca^{2+}]$, and tension), the morphological and functional changes in the cannabinoid receptors, nitric oxide synthases and cyclooxygenases in detrusor from insulin-resistant obese rat, a MS experimental model similar to that produced in man, in order to provide effective therapies in bladder dysfunction associated with MS.

Palabras clave: Receptores de cannabinoides, sintasas de óxido nítrico, ciclooxigenasas, detrusor, incontinencia urinaria, síndrome metabólico, rata Zucker obesa.

Antecedentes

El denominado síndrome metabólico (SM) engloba un conjunto de trastornos metabólicos y/o factores de riesgo de enfermedad cardiovascular interrelacionados, como son la obesidad central, la diabetes mellitus tipo II (DMII), la dislipidemia y la hipertensión que presentan como común denominador la ausencia de respuesta de los tejidos diana a la insulina plasmática o resistencia a la insulina. Dicha resistencia conduce a una hiperinsulinemia compensadora y a una intolerancia a la glucosa como consecuencia de la alteración en la absorción de la glucosa mediada por insulina (Ford y col, JAMA 287: 356, 2002). En los pacientes con SM se duplica la probabilidad de desarrollar enfermedad cardiovascular y se cuatuplica la de padecer DMII con respecto a los pacientes sin SM. La hiperinsulinemia desarrollada afecta al núcleo ventromedial hipotalámico, el cual regula la activación del Sistema Nervioso Simpático a este nivel incrementando así, los niveles de catecolaminas plasmáticas y tisulares produciendo finalmente una hiperactividad del Sistema Nervioso Simpático Periférico (DeFronzo y col, Diabetes Care 14: 173, 1991). La DMII está estrechamente relacionada con la obesidad crónica. La incidencia de la obesidad, definida como una condición crónica de excesivo tejido adiposo caracterizada por un índice de masa corporal igual o mayor de 30, se ha convertido en una auténtica pandemia en los países desarrollados. De hecho en el año 2000, entre un 15-20% de la población de dichos países era obesa, porcentajes que se han ido incrementando paralelamente al desarrollo de patologías como la DMII y la enfermedad cardiovascular (Seidell, Br J Nutr 83: S5, 2007). En el año 1995 existían 135 millones de personas con diabetes y se calcula que afectará a unos 300 millones en 2025, lo cual, incrementa la aparición de complicaciones clínicas asociadas de alto riesgo disparando, así, los gastos sanitarios derivados de la misma (Seidell, Br J Nutr 83: 5, 2007).

Los endocannabinoides y receptores de cannabinoides favorecen el desarrollo de diferentes factores de riesgo vascular en el SM y la DMII. De hecho, receptores de cannabinoides CB₁ están implicados en la cardiopatía diabética por favorecer el estrés oxidativo, la inflamación y la fibrosis del miocardio (Rajesh y col, Diabetes 61:716, 2012). Asimismo, en las arterias peneanas de ratas prediabéticas, bajo condiciones de resistencia a la insulina, la liberación y los efectos de prostanoïdes vasodilatadores, producidos en el endotelio por la actividad de las ciclooxigenasas (COX), estuvieron sensiblemente disminuidos (Sánchez y col, Br J Pharmacol 159: 604, 2010). Asimismo, en dicho lecho vascular, se ha descrito una disfuncionalidad del sistema nitrérgico como consecuencia del deterioro de la señalización del NO neuronal debido al estrés oxidativo y al desacoplamiento de la sintasa neuronal de NO (Sánchez y col., PLoS One. 7(4):e36027, 2012).

El llenado y vaciado de la vejiga urinaria es regulado por la actividad del Sistema Nervioso Autónomo. Así, el transporte de orina a través del uréter y su descarga a la vejiga son controlados por la liberación de neurotransmisores excitadores e inhibidores en el uréter intravesical. Entre los primeros cabe reseñar la noradrenalina (NA) (Hernández y col, Br J Pharmacol 107: 924, 1992), la acetilcolina (ACh) (Hernández y col, Br J Pharmacol 110: 1413, 1993), la serotonina (5-HT) (Hernández y col, Br J Pharmacol 138: 137, 2003) y péptidos como las taquicininas (Bustamante y col, J Urol 164: 1371, 2000; Bustamante y col, NeuroUrol Urodyn 20: 297, 2001). Entre los mediadores inhibidores destacan el óxido nítrico (NO) (Hernández y col, Neurosci Lett 186: 33, 1995; Hernández y col, Br J Pharmacol 120: 609, 1997) y la adenosina (Hernández y col, Br J Pharmacol 126: 969, 1999) que junto a péptidos como el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiario 38 (PACAP 38) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Hernández y col, Br J Pharmacol 149: 100, 2004) participan en la relajación ureteral favoreciendo, así, la progresión del bolo de orina a través del uréter y su descarga a la vejiga urinaria. La fase de llenado de la vejiga es iniciada por la distensión de la pared vesical producida por la llegada de orina, la cual, provoca la estimulación del nervio hipogástrico y consecuente liberación de NA que provoca la relajación del músculo detrusor vía activación de receptores adrenérgicos β_2 y β_3 y la contracción de la base de la vejiga a través de la conjugación de la NA a receptores adrenérgicos α_1 (Andersson y Wein, Pharmacol Rev 56: 581, 2004) y de endotelina-1 (ET-1) a receptores de endotelina ET_A (Arteaga y col, NeuroUrol Urodyn 31: 156, 2012). El vaciado de la vejiga se produce por activación del Sistema Nervioso Parasimpático, el cual, a través de la estimulación del nervio pélvico causa la liberación de ATP y ACh, que provocan la contracción del detrusor vía activación de receptores purinérgicos P2X₁ (Burnstock, BJU Int 107: 192, 2011) y muscarínicos M₂ y M₃ (Andersson y Wein, Pharmacol Rev

56: 581, 2004) y de NO, cuya liberación es modulada por receptores adrenérgicos α_2 (Hernández y col, *Neurourol Urodyn* 26: 578, 2007) y canales Kv (Hernández y col, *Br J Pharmacol* 153: 1251, 2008) de localización presináptica, produciendo relajación del cuello de la vejiga y la uretra a través de un mecanismo dependiente de la activación de la guanilato ciclasa (Andersson y Wein, *Pharmacol Rev* 56: 581, 2004; Hernández y col, *Br J Pharmacol* 153: 1251, 2008, Bustamante y col, *Neurosci Lett* 477: 91, 2010). Asimismo, se ha identificado un componente inhibidor independiente de NO que representa más del 50% de la relajación de la base de la vejiga vía activación de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la ATPasa de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (Martínez-Sáenz y col, *Neurourol Urodyn* 30: 151, 2011). Entre los neurotransmisores NANC inhibidores cabe destacar el ATP, la 5-HT y péptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria 38 (PACAP 38) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), los cuales, desempeñan un papel crucial en la relajación del cuello vesical. Así, ATP produce relajación del músculo liso del cuello de la vejiga del cerdo a través de receptores purinérgicos P2Y_1 y $\text{A}_{2\text{A}}$ (Hernández y col, *Br J Pharmacol* 157: 1463, 2009). La 5-HT, cuyo efecto es modulado por receptores serotoninérgicos presinápticos $5\text{-HT}_{1\text{A}}$, produce relajación vía receptores musculares 5-HT_7 acoplados a la vía de la PKA sin involucrar activación de canales de K^+ de localización postsináptica (Recio y col, *Br J Pharmacol* 157: 271, 2009). Finalmente VIP y PACAP 38 producen relajación del cuello de la vejiga a través de receptores del subtipo VPAC_2 acoplados a la vía de la protein cinasa dependiente del AMPc (PKA) (Hernández y col, *Neurourol Urodyn* 25: 490, 2006, Hernández y col, *Br J Pharmacol* 149: 100, 2006), mientras que el CGRP y la ET-1 producen relajación de la base de la vejiga vía activación de receptores CGRP_2 (Martínez-Sáenz y col, *J Urol* 186: 728, 2011) y ET_B (Arteaga y col, *Neurourol Urodyn* 31: 688, 2012), respectivamente, acoplados a la vía de la PKA. Otros péptidos como la bradisinina (BK) producen un efecto dual, relajante y/o contráctil, a través de la activación de receptores de BK B_2 presentes en las terminaciones nerviosas y en el músculo liso, respectivamente (Ribeiro y col., *Neurourol Urodyn* 33: 558, 2014). Recientemente, nuestro laboratorio ha descrito, asimismo, un papel clave del sulfuro de hidrógeno (H_2S) como molécula gaseosa señalizadora en la neurotransmisión del uréter intravesical (Fernandes y col., *Plos One* 9(11): e113580, 2014) y el cuello vesical (Fernandes y col., *J Urol* 189: 1567, 2013), produciendo la relajación de la musculatura lisa a través de la activación de canales K_{ATP} y mecanismos de desensibilización del Ca^{2+} intracelular (Fernandes et al., *J Urol* 190: 746, 2013).

Tanto el SM (Ouslander, *N Engl J Med* 350: 786, 2004) como la DMII (Tai y col, *J Clin Endocrinol Metab* 95: 1143, 2010) son conocidos factores de riesgo del denominado cuadro de síntomas del Tracto Urinario Inferior (STUI) y de la vejiga hiperactiva (VH). El STUI incluye al menos 3 o 4 signos clínicos como son: nocturia, vaciado incompleto de la vejiga y chorro miccional vacilante y debilitado (Park y col, *Urology* 72: 556, 2008). Estudios epidemiológicos muestran una estrecha relación entre el hiperinsulinemia característica de la enfermedad cardiovascular, la diabetes, la obesidad y los factores de riesgo desencadenantes del SM con la aparición de STUI en hombres de avanzada edad (Kupelian y col, *J Urol* 82: 616, 2009). De hecho, factores de riesgo vascular, como la obesidad, la diabetes, la aterosclerosis, la dislipidemia, la hiperglucemia y la hipertensión están estrechamente relacionados con la presencia de STUI en ambos sexos, siendo, no obstante más frecuente su aparición en los varones (Shenfeld y col, *Urology* 65: 181, 2005). Esto es debido a que en los hombres existe una mayor cantidad de grasa visceral y contenido graso en el hígado como consecuencia de la ausencia del efecto protector cardiovascular de los estrógenos dando lugar a una resistencia a la insulina incrementada en varones con adiposidad visceral elevada (Shenfeld y col, *Urology* 65: 181, 2005). Con el envejecimiento el riesgo de padecer diabetes y enfermedad cardiovascular se incrementa considerablemente junto con los episodios de incontinencia urinaria (IU) asociados con la obesidad. Así, individuos obesos de ambos sexos presentan una mayor incidencia de episodios de IU de urgencia producidos por hiperactividad del detrusor (Lee y col, *J Urol* 179: 2470, 2008; Irwin y col, *Eur Urol* 58: 532, 2010). Estudios urodinámicos muestran que pacientes con DMII presentan flujos miccionales disminuidos y volúmenes residuales incrementados (Changolkar y col, *J Urol* 173: 309, 2005). La actividad exarcebada del Sistema Nervioso Autónomo puede modificar los procesos de neurotransmisión y, por ende, la contractilidad del detrusor y de la base de la vejiga contribuyendo, así, al desarrollo de VH y STUI (McVary y col, *J Urol* 174: 1327, 2005). La vía de la Rho kinasa a través de la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina promueve la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y la contracción a través de la interacción actina-miosina. La actividad α -adrenérgica estimula la vía de la Rho-kinasa vinculando, así, la vía de la Rho kinasa y la

hiperactividad autónoma característica del SM (McVary y col, J Urol 174: 1327, 2005). Esta vía es, asimismo, estimulada por péptidos como la ET-1, lo cual, explicaría el incremento en la producción de ET-1 en pacientes diabéticos (Takahashi y col, NeuroUrol Urodyn 26: 547, 2007).

La VH es un complejo cuadro sintomatológico multifactorial representado por un incremento de la frecuencia miccional, urgencia con o sin incontinencia y nocturia (Lee y col, J Urol 196: 318, 2011). Trastornos del SM, tales como la DMII, niveles del colesterol de alta densidad reducidos, niveles de triglicéridos elevados, hipercolesterolemia con aterosclerosis e hipertensión combinada con hiperlipidemia son factores de riesgo de la VH en modelos animales y en el hombre (Azadzi y col, J Urol 169: 1885, 2003; Nobe y col, J Pharmacol Exp Ther 324: 631, 2008; Huang y col, J Urol 183: 1232, 2010). Ratas diabéticas por alto consumo de fructosa o por administración de estreptozotina muestran una cistometría alterada caracterizada por contracciones fásicas incrementadas e hiperactividad del detrusor (Yang y col, J Urol 178: 2213, 2007; Liu y col, NeuroUrol Urodyn 27: 429, 2008). Estos animales, además, presentan un peso de la vejiga y una capacidad y distensibilidad vesical incrementados y consumen y excretan mayores volúmenes de agua en comparación con sus controles (Lee y col, J Urol 179: 2470, 2008). Las ratas diabéticas presentan, asimismo, hipertrofia, fibrosis, contenido total de colágeno reducido y edema y vasculopatía de la pared de la vejiga (Torimoto y col, J Urol 171: 1959, 2004; Gasbarro et al, Am J Physiol Renal Physiol 298: F72, 2010). De hecho, la hiperactividad del Sistema Nervioso Simpático, característica de trastornos asociados al SM como la hipertensión y la aterosclerosis, contribuye a alteraciones en el flujo sanguíneo del Tracto Urinario Inferior provocando, así, la aparición de VH y STUI (Matsumoto y Kakizaki, Int J Urol 19: 20, 2012). Procesos isquémicos moderados de la vejiga provocan daño del urotelio y de los nervios intramurales dando lugar a la hiperactividad del detrusor e incremento de la frecuencia urinaria, mientras que la isquemia severa y la lesión originada por la reperfusión resultante, como consecuencia de la formación de radicales libres, están asociadas con una contracción reducida del detrusor también conocida como vejiga de baja actividad (Matsumoto y Kakizaki, Int J Urol 19: 20, 2012). La neuropatía hiperglicémica, la hipertrofia vesical inducida por diuresis y las alteraciones metabólicas son las responsables de la disfuncionalidad vesical (Yoshimura y col, BJU Int 95: 733, 2005). Así, la hiperglucemia crónica favorece la formación incrementada de especies de nitrógeno reactivas, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la regulación a la baja de la proteína proapoptótica Bcl-2 y la activación de vías intrínsecas de apoptosis responsables de la neuropatía y la miopatía diabéticas que caracterizan el progresivo fallo de la funcionalidad vesical (Lee y col, J Urol 196: 318, 2011). La sintomatología de la VH que aparece en pacientes diabéticos es posiblemente debida a una reducción de la contractilidad vesical, la cual, es el resultado de una fase de activación colinérgica deficitaria y una hipertrofia compensadora del detrusor que produce finalmente un incremento de la frecuencia miccional. De hecho, se ha demostrado una sobreexpresión de receptores muscarínicos postsinápticos, fundamentalmente del subtipo M₃, una hipertrofia del detrusor y una contractilidad colinérgica disminuída (Lee y col, J Urol 196: 318, 2011). En resumen, en las ratas diabéticas es característico un notable incremento del volumen y la frecuencia miccional y de la distensibilidad vesical (Torimoto y col, J Urol 171: 1959, 2004; Liu y col, NeuroUrol Urodyn 27: 429, 2008). El remodelado morfológico y biomecánico de la pared vesical producido en el SM contribuye a la disfunción motora vesical y al cuadro sintomatológico de la VH y el STUI y esto justifica el desarrollo de modelos experimentales para una correcta comprensión de los mecanismos fisiopatológicos responsables de la IU en pacientes obesos y diabéticos. Las ratas Zucker obesas (OZR) presentan una mutación del gen del receptor de leptina desarrollando, así, DMII independientemente de la dieta. La DMII, la obesidad y las complicaciones derivadas de la misma alteran la función normal del Tracto Urinario Inferior en las ratas OZR, lo que las convierte en un modelo óptimo para el estudio de la disfuncionalidad vesical asociada al SM en el hombre (Gasbarro y col, Am J Physiol Renal Physiol 298: F72, 2010).

Bibliografía más relevante

- Andersson KE, Wein AJ (2004). Pharmacology of the lower urinary tract... *Pharmacol Rev* 56: 581.
- Arteaga JL y col (2012). Mechanisms involved in endothelin-1... *Neurourol Urodyn* 31: 156.
- Arteaga JL y col (2012). Endothelin ET_B receptors are involved... *Neurourol Urodyn* 31: 688.
- Azadzi KM y col (2003). Increased leukotriene and prostaglandin release... *J Urol* 169: 1885.
- Burnstock G (2011). Therapeutic potential of purinergic signalling for... *BJU Int* 107: 192.
- Bustamante S y col (2000). Tachykininergic excitatory transmission in the pig... *J Urol* 164: 1371.
- Bustamante S y col (2001). NK₂ tachykinin receptors mediate... *Neurourol Urodyn* 20: 297.
- Bustamante S y col (2010). Functional evidence of nitrergic transmission... *Neurosci Lett* 477: 91.
- Changolkar AK y col (2005). Diabetes induced decrease in detrusor... *J Urol* 173: 309.
- DeFronzo RA y col (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome... *Diabetes Care* 14: 173.
- De Groat WC (2006). Integrative control of lower urinary. *Br J Pharmacol* 147: S25.
- Fernandes VS y col (2013a). Endogenous hydrogen sulfide has a powerful role.... *J Urol* 189: 1567.
- Fernandes VS y col (2013b). Hydrogen sulfide mediated inhibitory neurotransmission.....*J Urol* 190: 746.
- Fernandes VS y col (2014). Hydrogen sulfide plays a key role in the... *PLoS One* 9(11): e113580.
- Ford ES y col (2002). Prevalence of the metabolic syndrome among US adults... *JAMA* 287: 356.
- Gasbarro G y col (2010). Voiding function in obese... *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F72.
- Hernández M y col (1992). Noradrenaline modulates smooth muscle... *Br J Pharmacol* 107: 924.
- Hernández M y col (1993). Different muscarinic receptor subtypes... *Br J Pharmacol* 110: 1413.
- Hernández M y col (1995). Nitric oxide is involved in the non-adrenergic... *Neurosci Lett* 186: 33.
- Hernández M y col (1997). Involvement of a glibenclamide-sensitive... *Br J Pharmacol* 120: 609.
- Hernández M y col (1999). A2B adenosine receptors mediate relaxation... *Br J Pharmacol* 126: 969.
- Hernández M y col (2003). Characterization of 5-hydroxytryptamine... *Br J Pharmacol* 138: 137.
- Hernández M y col (2004). Heterogeneity of neuronal and smooth muscle..*Br J Pharmacol* 141: 123.
- Hernández M y col (2006). Neuronal and smooth muscle receptors... *Br J Pharmacol* 149: 100.
- Hernández M y col (2006). PACAP 38 is involved in the non-adren... *Neurourol Urodyn* 25: 490.
- Hernández M y col (2007). Pre-junctional alpha₂-adrenoceptors... *Neurourol Urodyn* 26: 578.
- Hernández M y col (2008). Role of neuronal voltage-gated K(+)... *Br J Pharmacol* 153: 1251.
- Hernández M y col (2009). Role of ATP and related purines in... *Br J Pharmacol* 157: 1463.
- Huang YC y col (2010). Adipose derived stem cells ameliorate hyperlipidemia... *J Urol* 183: 1232.
- Irwin DE y col (2010). Dynamic progression of overactive bladder and urinary... *Eur Urol* 58: 532.
- Kupelian V y col (2009). Association of lower urinary tract symptoms and... *J Urol* 182: 616.
- Lee WC y col (2008). Bladder dysfunction in rats with metabolic syndrome... *J Urol* 179: 2470.
- Lee WC y col (2011). Pathophysiological studies of overactive bladder... *J Urol* 186: 318.
- Liu G y col (2008). External urethral sphincter activity in diabetic... *Neurourol Urodyn* 27: 429.
- Martínez-Sáenz A y col (2011). Mechanisms involved in the nitric... *Neurourol Urodyn* 30: 151.
- Martínez-Sáenz A y col (2011). Role of calcitonin gene-related peptide in... *J Urol* 186: 728.
- Matsumoto S y Kakizaki H (2012). Causative significance of bladder blood flow... *Int J Urol* 19: 20.
- McVary KT y col (2005). Autonomic nervous system overactivity in men... *J Urol* 174: 1327.
- Nobe K y col (2008). Alterations of glucose-dependent and ... *J Pharmacol Exp Ther* 324: 631.
- Ouslander JG (2004). Management of overactive bladder. *N Engl J Med* 350: 786.

Park HK y col (2008). Relationship between lower urinary tract symptoms and... Urology 72: 556.

Recio P y col (2009). 5-hydroxytryptamine induced relaxation in... Br J Pharmacol 157: 271.

Rajesh y col (2012). Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction..Diabetes 61:716, 2012

Ribeiro AS y col (2014). Neuronal and non-neuronal bradykinin receptors... Neurourol Urodyn 33: 558.

Sánchez y col (2010). Altered arachidonic acid metabolism via COX-1 and... Br J Pharmacol 159: 604.

Sánchez y col (2012). Role of neural NO synthase (nNOS) uncoupling... PLoS One. 7(4):e36027, 2012

Seidell JC (2007). Obesity, insulin resistance and diabetes: a worldwide epidemic. Br J Nutr 83: S5.

Shenfeld OZ y col (2005). Do atherosclerosis and bladder ischemia play a role in... Urology 65: 181.

Tai HC y col (2010). Metabolic syndrome components worsen... J Clin Endocrinol Metab 95: 1143.

Takahashi R y col (2007). RhoA/Rho kinase-mediated Ca²⁺... Neurourol Urodyn 26: 547.

Torimoto K y col (2004). Urethral dysfunction in diabetic rats. J Urol 171: 1959.

Yang Z y col (2007). Diabetic urethropathy compounds the effects of diabetic... J Urol 178: 2213.

Yoshimura N y col (2005). Recent advances in understanding the biology of diabetes. BJU Int 95:

Hipótesis

Tanto el síndrome metabólico (SM) como la diabetes mellitus tipo II (DMII) son conocidos factores de riesgo de la vejiga hiperactiva (VH) y de los síntomas del Tracto Urinario Inferior (STUI). Estudios epidemiológicos han mostrado una estrecha relación entre la hiperinsulinemia característica de la enfermedad cardiovascular, la diabetes, la obesidad y los factores de riesgo desencadenantes del SM con la aparición de VH y STUI en hombres de avanzada edad (Kupelian y col, J Urol 82: 616, 2009). Con el envejecimiento el riesgo de padecer diabetes y enfermedad cardiovascular se incrementa considerablemente junto con episodios de IU asociados con la obesidad. Así, individuos obesos de ambos sexos presentan una mayor incidencia de episodios de IU de urgencia y de estrés tipo III, producidos por hiperactividad del detrusor y por deficiencia esfintérica intrínseca, respectivamente. La hiperinsulinemia desarrollada secundariamente a la resistencia a la insulina produce una hiperactivación del Sistema Nervioso Periférico, modificando así la regulación neurovegetativa y por tanto la contractilidad de la musculatura lisa del detrusor contribuyendo, de esta manera, al desarrollo de VH y STUI. De hecho, en la diabetes es característico un notable incremento del volumen y la frecuencia miccional, la distensibilidad vesical y la existencia de alteraciones anatómicas y funcionales de la pared vesical y de la base de la vejiga, lo cual, favorece la presencia de cuadros de IU de urgencia y de estrés tipo III (Torimoto y col, J Urol 171: 1959, 2004).

A pesar de que tanto la obesidad como la diabetes son factores de riesgo de IU, **el cuerpo de conocimiento actual en relación con la sintomatología miccional asociada al Síndrome Metabólico es muy limitado**. De hecho, existe una escasa información sobre los mecanismos fisiopatológicos neurovegetativos responsables de la disfuncionalidad vesical característica en pacientes con SM, lo cual, es esencial en aras a posibilitar la elección de terapias farmacológicas efectivas en dichas patologías. La originalidad del presente proyecto se vincula, por tanto, precisamente a esta extrapolación patogénica y clínica desde el modelo experimental y la metodología presentada.

Objetivos

Ya que tanto los receptores de cannabinoides (Rajesh y col, Diabetes 61:716, 2012) como las sintasas de NO (Sánchez y col., PLoS One. 7(4):e36027, 2012) y las COX (Sánchez y col, Br J Pharmacol 159: 604, 2010) desempeñan un papel fundamental en la disfuncionalidad cardiovascular asociada al SM, el presente estudio va dirigido a investigar las modificaciones en la expresión y funcionalidad de dichos receptores y de las enzimas de síntesis de NO y de prostanoïdes en el detrusor de la rata Zucker obesa, modelo experimental de SM similar al producido en el hombre. Para ello, se diseccionarán preparaciones longitudinales pertenecientes al detrusor de ratas machos Zucker obesas (RZO) y sus correspondientes controles, ratas Zucker delgadas *Lean* (RZL). En dichas muestras, utilizando diferentes abordajes experimentales (inmunohistoquímica, *Western blot*, registro de fuerza isométrica y medida simultánea de $[Ca^{2+}]_i$ y tensión), se estudiarán:

1º. La expresión y funcionalidad de los receptores de cannabinoides presentes en las terminaciones nerviosas intramurales de la pared de la vejiga urinaria. Para ello llevaremos a cabo estudios de *Western blot* y de inmunofluorescencia de doble marcaje para los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂ junto con la proteína neuronal PGP 9.5, y estudios funcionales de fuerza isométrica y medida simultánea de Ca²⁺ y tensión para valorar la acción de agonistas y antagonistas selectivos de dichos receptores sobre la contracción inducida por la estimulación eléctrica transmural (EET) y la acetilcolina (ACh) en el detrusor de las rata RZO.

2º. La expresión y funcionalidad de la sintasas de NO endotelial (NOS_e), neuronal (NOS_n) e inducible (NOS_i) presentes en la pared vesical. Para ello realizaremos estudios de *Western blot* y de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para la NOS_e, NOS_n y la NOS_i, y estudios funcionales de fuerza isométrica y medida simultánea de Ca²⁺ y tensión para valorar la acción de bloqueantes de dicha sintasas de NO sobre la contracción inducida por la EET y la ACh en el detrusor de la rata obesa.

3º. La expresión y funcionalidad de la ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 de la pared de la vejiga urinaria. Para ello realizaremos estudios de *Western blot* y de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para la COX-1 y COX-2, y estudios funcionales de fuerza isométrica y medida simultánea de Ca²⁺ y tensión para valorar la acción de bloqueantes selectivos de la COX-1 y COX-2 sobre la contracción inducida por la EET y la ACh en el detrusor de la rata obesa RZO.

MATERIAL BIOLÓGICO

En el presente proyecto se utilizarán ratas macho *Zucker* obesas (RZO) y sus correspondientes controles, ratas *Zucker delgadas lean* (RZL) de 8 a 10 semanas de edad, las cuales, serán suministradas por la empresa *Charles River Laboratories* (Barcelona). Los animales serán estabulados en las instalaciones del Animalario de la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y mantenidos por personal especializado que les proveerá de dieta standard y agua *ad libitum* hasta su posterior sacrificio a las 17-18 semanas de edad mediante inhalación de CO₂ y posterior exanguinación por decapitación. Las condiciones ambientales y de estabulación de los animales estarán de acuerdo a los procedimientos referidos a las medidas sanitarias y de bienestar animal recogidos en el Real Decreto de 10 de Octubre de 2005 (nº 1201/2005) en consonancia con las directrices de la Unión Europea para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio y todos los protocolos experimentales serán llevados a cabo bajo la aprobación y supervisión del Comité Ético del Experimentación Animal de la UCM. Las vejigas se transportarán en un termo con solución salina fisiológica (SSF) a 4°C al Laboratorio de Músculo Liso de la Sección Departamental. Posteriormente, en placas de microdisección se procederá a la eliminación de grasa y tejido conectivo circundante y se aislarán tiras longitudinales, con urotelio intacto y desprovistas del mismo, de 3 mm de longitud y 1.5 mm de anchura pertenecientes al detrusor de las ratas RZO y RZL.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

- **Inmunohistoquímica.** Para evidenciar la expresión de receptores de cannabinoides CB₁ (CB_{1r}) y CB₂ (CB_{2r}), sintasas de NO endotelial (NOS_e), neuronal (NOS_n) e inducible (NOS_i) y ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, las muestras serán fijadas en paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato (PB) 0.1 M pH 7.4, durante 24-48 horas, a 4° C y a continuación se sumergirán en sacarosa al 30 % en PB, para su crioprotección. Las preparaciones serán congeladas en CO₂ y almacenadas a -80° C. Posteriormente, se obtendrán secciones longitudinales y transversales de 40 a 50 µm, mediante un microtomo de congelación. Las secciones se procesarán para inmunohistoquímica. Las muestras serán preincubadas en suero de cabra al 10 % en PB conteniendo Tritón X-100 al 0.3 %, durante 2-3 horas y luego serán incubadas en PB conteniendo un anticuerpo primario específico de CB_{1r} y CB_{2r}, NOS_e, NOS_n, NOS_i, COX-1 y COX-2 (*Santa Cruz Biotechnology Inc*), junto con el anticuerpo de la proteína PGP 9.5 (*Abcam*), marcador específico de nervios, a la dilución adecuada. Las secciones serán incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado (*Invitrogen*) a la dilución adecuada, durante 2 horas a temperatura ambiente, y luego incubadas con el complejo ABC (*Vector*) durante 90 minutos. El inmunocomplejo será revelado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) al 0.05 % y H₂O₂ al 0.001 % en PB.

- **Western blot.** Con objeto de mostrar la expresión de los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂, sintasas de NO, NOS_e, NOS_n y NOS_i, así como, ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 en el detrusor de las ratas RZO y sus correspondientes controles, las muestras serán homogeneizadas en un tampón de lisis conteniendo Tris-HCl 10 mM (pH= 7.4), sulfato sódico de dodecilo (SDS) al 1 % y vanadato sódico 1 mM. Las muestras (15 µg de proteína) se someterán a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % y posteriormente serán transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) que se bloquearán con suero total o leche en polvo desnatada. Las membranas se incubarán a continuación, en las condiciones de dilución, tiempo y temperatura requeridas para cada anticuerpo, con el anticuerpo primario específico del receptor en estudio (obtenido del proveedor adecuado en cada caso) o con un anti- α -actina (*Sigma*), a lo que seguirá la incubación con anticuerpo secundario (dirigido contra el huésped en el que se haya obtenido el primario) conjugado con peroxidasa (*Amersham Life Sciences*). Las proteínas serán detectadas con un *kit* de *Amersham Life Sciences*. El nivel de expresión de cada proteína será presentado como un cociente de la densidad de la banda objeto de estudio respecto a la de α -actina en la misma muestra.

- **Funcionalidad de los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂, sintasas de NO y ciclooxigenasas COX-1 y COX-2.** Las muestras serán montadas en miógrafos de 6 ml de capacidad para registro de tensión isométrica (*Danish Myo Technology, DMT Inc*) y serán

sometidas a una tensión inicial de 1.5 g en SSF aireada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) a 37° C durante un periodo de 60 min. La capacidad contráctil de las muestras será comprobada al inicio del experimento mediante su exposición a una solución enriquecida en K⁺ (SSF-K, 124 mM). Sobre el tono basal de las preparaciones se realizarán curvas de contracción inducida por la estimulación eléctrica transmural (EET, 0.5-16 Hz, 1 ms de duración, trenes de 20 s, con la corriente de salida constante ajustada a 75 mA) y acetilcolina (ACh, 10 nM-1 mM). A continuación se renovará la SSF durante 60 min, y entonces las preparaciones serán incubadas con agonistas y antagonistas de receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂, de bloqueantes selectivos de las tres isoformas de la NOS, así como, de la COX-1 y COX-2 durante un periodo de 30 min y entonces se realizará una segunda curva de contracción.

• **Medida simultánea de [Ca²⁺]_i y tensión.** Se llevarán a cabo registros simultáneos de [Ca²⁺]_i y tensión basales y estimulados en preparaciones intactas de detrusor de RZO y de RZL mediante fluorescencia con FURA-2 AM como previamente hemos descrito (Fernandes y col, J Urol 190: 746, 2013). Así, las preparaciones serán cargadas en oscuridad en SSF conteniendo 8 μM FURA-2 AM y 0.05% de *Cremophor EL* durante un período de 2 h a 37°C. Posteriormente las muestras serán lavadas 3 veces con SSF y posteriormente la solución será cambiada a SSF con FURA-2 AM. La cámara del miógrafo se colocará sobre un microscopio invertido *Zeiss* para fluorimetría de longitud de onda de excitación dual (*Deltascan, Photon Technology*). Las preparaciones serán iluminadas con haces de luz de 340 y 380 nm alternativamente, y la intensidad de la fluorescencia emitida será recogida con una longitud de onda de 510 nm mediante un fotomultiplicador y registrada junto con la tensión desarrollada. Al final de cada experimento, las señales insensibles al Ca²⁺ serán determinadas después del enfriamiento con manganeso y los valores obtenidos serán sustraídos de aquellos obtenidos durante el experimento. El cociente de fluorescencia a 340 y 380 nm (F₃₄₀/F₃₈₀) corregido para autofluorescencia será tomado como medida de [Ca²⁺]_i.

CÁLCULOS y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La sensibilidad de los diferentes agonistas será expresada en valores de pD₂, siendo pD₂ el logaritmo negativo de la EC₅₀ (pD₂= -log EC₅₀). Dichos valores serán estimados mediante análisis de regresión no lineal (*GraphPad Prism*). Las diferencias estadísticas serán calculadas con el test de la *t* de Student para observaciones pareadas y mediante de análisis de varianza (ANOVA) para comparaciones múltiples. Las diferencias serán consideradas significativas con un nivel de probabilidad de *P*<0.05.

Plan de trabajo

El proyecto solicitado se realizará en el Laboratorio de Investigación de Músculo Liso de la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la UCM durante un periodo de **TRES AÑOS** (Junio 2015/Junio 2018) estructurado en tres etapas (ANUALIDADES) claramente diferenciadas en relación con los objetivos planteados. Así, el cronograma se establece de la siguiente manera:

1ª ANUALIDAD: La expresión y funcionalidad de los receptores de cannabinoides localizados en las terminaciones nerviosas de la pared de la vejiga urinaria, incluyendo estudios de *Western blot* e inmunofluorescencia de doble marcaje para los receptores CB₁ y/o CB₂ junto con la proteína neuronal PGP 9.5, así como, estudios funcionales de fuerza isométrica y medida simultánea de Ca²⁺ y tensión para valorar la acción de agonistas y antagonistas de dicho receptores sobre la contracción inducida por la EET y la ACh en el detrusor de la rata RZO.

2ª ANUALIDAD: La expresión y funcionalidad de la sintasas de NO, NOS_e, NOS_n y NOS_i, incluyendo estudios de *Western blot* e inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para dichas sintasas de NO, así como, estudios funcionales para valorar la acción de bloqueantes de las mismas sobre la contracción inducida por la EET y la ACh en el detrusor de la rata obesa.

3ª ANUALIDAD: La expresión y funcionalidad de la ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 de la pared de la vejiga urinaria, incluyendo estudios de *Western blot* y de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para dichas ciclooxigenasas, así como, estudios funcionales para valorar la acción de bloqueantes selectivos de las mismas sobre la contracción inducida por la EET y la ACh en el detrusor de la rata obesa RZO.

La distribución de tareas en función de los miembros del equipo investigador será el siguiente:

1ª ANUALIDAD: Dr. Medardo Hernández/ Dra. Paz Recio/ Dra. Sara Benedito/ Dra. Cristina Martínez/ Dr. Ángel Agis-Torres/ Dra. Ana Martínez-Sáenz/ Dra. Ana Ribeiro/ Ldo. Vítor Fernandes/ Ldo. Igor Blaha/ Dr. David Vázquez/ Dr. Salvador Bustamante/ (Protocolo experimental y análisis estadístico).

2ª ANUALIDAD: Dr. Medardo Hernández/ Dra. Paz Recio/ Dra. Sara Benedito/ Dra. Cristina Martínez/ Dr. Ángel Agis-Torres/ Dra. Ana Martínez-Sáenz/ Dra. Ana Ribeiro/ Ldo. Vítor Fernandes/ Ldo. Igor Blaha/ Dr. David Vázquez/ Dr. Salvador Bustamante/ (Protocolo experimental y análisis estadístico).

3ª ANUALIDAD: Dr. Medardo Hernández/ Dra. Paz Recio/ Dra. Sara Benedito/ Dra. Cristina Martínez/ Dr. Ángel Agis-Torres/ Dra. Ana Martínez-Sáenz/ Dra. Ana Ribeiro/ Ldo. Vítor Fernandes/ Ldo. Igor Blaha/ Dr. David Vázquez/ Dr. Salvador Bustamante/ (Protocolo experimental y análisis estadístico).

INFORMES ANUALES Y FINAL: Dr. Medardo Hernández.

- Los doctores Hernández, Recio, Agis-Torres, Martínez-Sáenz, Ribeiro, Vázquez y Bustamante, así como, los licenciados Fernandes y Blaha tendrán **DEDICACIÓN ÚNICA**.

- Los doctores Benedito y Martínez tendrán **DEDICACIÓN COMPARTIDA**.

Experiencia del equipo investigador sobre el tema

La actividad de nuestro grupo, integrado por investigadores básicos y clínicos, con dilatada experiencia en el estudio de la funcionalidad vesical en modelos fisiológicos y fisiopatológicos, con marcado carácter de investigación traslacional a la práctica clínica urológica y visible en la trayectoria curricular, ha ido dirigida al estudio del control del Sistema Nervioso Autónomo sobre la actividad de la musculatura lisa visceral y vascular del Tracto Urinario, utilizando diferentes especies domésticas, así como, muestras humanas. De forma más específica, y en lo que se refiere al tema del proyecto solicitado, los estudios llevados a cabo han establecido un modelo experimental *in vitro* para el estudio de los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos responsables del transporte de orina a través del uréter y su descarga a la vejiga y de los procesos de llenado y vaciado vesical. Dichos estudios se han llevado a cabo mediante diferentes enfoques metodológicos. Así, se han realizado:

1. Estudios neuroanatómicos para la visualización de nervios noradrenérgicos, colinérgicos y NANC. Dichos estudios revelan una rica inervación adrenérgica, colinérgica y NANC a nivel del uréter intravesical y de la vejiga urinaria (Prieto y col, Anat Histol Embryol 19: 276, 1990, Res Vet Sci 54: 312, 1993, J Auton Nerv Syst 47: 159, 1994, Regul Pept 69: 155, 1997; Hernández y col, Neurosci Lett 186: 33, 1995).

2. Estudios fisiofarmacológicos para la caracterización de receptores que median la respuesta adrenérgica, colinérgica y NANC. Dichos estudios indican que NA y ACh estimulan la contracción ureteral vía receptores adrenérgicos α_1 y α_2 y muscarínicos M_1 , M_2 , M_3 y M_4 , respectivamente (Hernández y col, Br J Pharmacol 107: 924, 1992, Br J Pharmacol 110: 1413, 1993). 5-HT estimula el tono ureteral vía receptores 5-HT_{2A} (Hernández y col, Br J Pharmacol 138: 137, 2003). El NO está involucrado en la transmisión inhibitoria ureteral a través de la activación de canales K_{ATP} (Hernández y col, Br J Pharmacol 120: 609, 1997). La adenosina modula la transmisión NANC excitadora ureteral, relajando el músculo vía receptores A_{2B} (Hernández y col, Br J Pharmacol 126: 969, 1999). En el cuello, el NO provoca relajación vía mecanismo dependiente del GMPc (Hernández y col, NeuroUrol Urodyn 26: 578, 2007, Br J Pharmacol 153: 1251, 2008), mientras que un componente inhibitorio independiente de NO produce relajación vía activación de la COX-1 (Martínez-Sáenz y col, NeuroUrol Urodyn 30: 151, 2011). El ATP promueve relajación del cuello vía receptores purinérgicos $P2Y_1$ y A_{2A} (Hernández y col, Br J Pharmacol 157: 1463, 2009). La 5-HT induce relajación vía receptores 5-HT₇ (Recio y col, Br J Pharmacol 157: 271, 2009). El inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4), rolipram, origina una relajación de la base de la vejiga de mayor magnitud que la promovida por los inhibidores de la PDE 5 sildenafil y vardebafile (Ribeiro y col., J Sex Med 11: 930, 2014). El H₂S desempeña, asimismo, un papel fundamental en la neurotransmisión inhibitoria del uréter intravesical (Fernandes y col., PLoS One 9(11): e113580, 2014) y el cuello vesical (Fernandes y col, J Urol 189: 1567, 2013) produciendo relajación de la musculatura lisa vía activación de canales K_{ATP} y mecanismos dependientes de la desensibilización del Ca^{2+} (Fernandes y col, J Urol, 190: 746, 2013).

3. Estudios neuroanatómicos y fisiofarmacológicos para investigar el papel desempeñado por péptidos localizados en terminaciones nerviosas motoras (Prieto y col, Regul Pept 69: 155, 1997; Hernández y col, Br J Pharmacol 141: 123, 2004) y en aferentes primarias sensibles a la capsaicina (Bustamante y col, J Urol 164: 1371, 2000, NeuroUrol Urodyn 20: 297, 2001) que forman parte de la inervación intrínseca del uréter y del cuello vesical. El NPY incrementa la contracción ureteral inducida por NA vía receptores Y_2 . NKA participa en la transmisión NANC excitadora ureteral vía receptores NK_2 . VIP y PACAP relajan el uréter (Hernández y col, Br J Pharmacol 141: 123, 2004) y el cuello vesical (Hernández y col, NeuroUrol Urodyn 25: 490, 2006, Br J Pharmacol 149: 100, 2006) vía población heterogénea de receptores VPAC acoplados a la PKA. El CGRP produce relajación de dicha estructura vía activación de receptores $CGRP_2$ acoplados a la vía de la PKA (Martínez-Sáenz y col, J Urol 186: 728, 2011). Finalmente, la ET-1 produce contracción y relajación del cuello vesical vía receptores de endotelina ET_A (Arteaga y col, NeuroUrol Urodyn 31: 156, 2012) y ET_B (Arteaga y col, NeuroUrol Urodyn 31: 688, 2012), respectivamente. BK produce contracción del cuello vesical vía receptores musculares B_2 acoplados a la entrada de Ca^{2+} extracelular y relajación a través de receptores B_1 uroteliales vía activación de la COX-1 y canales BK_{Ca} (Ribeiro y col, NeuroUrol Urodyn, 33: 558, 2014).

Además de los estudios en el Tracto Urinario, el investigador principal ha llevado a cabo una dilatada actividad investigadora referida a la disfuncionalidad nerviosa y endotelial de las arterias peneanas de resistencia de ratas obesas RZO. Dicha labor ha dado lugar a la

publicación de una decena de artículos en revistas internacionales de alto índice de impacto (Br J Pharmacol, Am J Physiol Heart Physiol Circ Physiol, Atherosclerosis, J Sex Med y PLoS One).

Plan de difusión: Relevancia del proyecto en cuanto a su impacto clínico, asistencial y / o desarrollo tecnológico

El presente estudio es un proyecto de investigación básica que pretende aportar una herramienta efectiva en la terapéutica de la clínica urológica asociada a la obesidad y a la diabetes. Dicho proyecto se enmarca en las directrices de la Acción Estratégica en Salud (AES) integrada en el Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 y sus objetivos de forma genérica se encuadran en tres de las cinco líneas principales referidas a:

- **Línea 2: Investigación traslacional sobre la salud humana.** Nuestro estudio va dirigido a investigar las alteraciones morfológicas y funcionales de la vejiga urinaria en un modelo experimental de SM. Así, se estudiarán las modificaciones en la expresión y funcionalidad de los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂, las sintasas de NO endotelial, neuronal e inducible, así como, las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 en el detrusor de la rata Zucker obesa, modelo experimental de SM similar al producido en el hombre.
- **Línea 4: Fomento de la investigación farmacéutica en medicamentos y desarrollo de tecnologías farmacéuticas. Investigación, Desarrollo e Innovación en fármacos para el tratamiento de las enfermedades más relevantes.** El desarrollo y la utilización de modelos animales de las enfermedades humanas permiten la evaluación de la eficacia y seguridad de los medicamentos. El uso de la rata Zucker obesa como modelo de SM es esencial para la investigación de nuevos fármacos con potencial terapéutico en las incontinencias urinarias de urgencia y de estrés tipo III asociadas al SM.
- **Línea 5: El Sistema Nacional de Salud como plataforma de desarrollo de investigación científica y técnica junto con el entorno industrial y tecnológico.** Uno de los objetivos fundamentales del presente estudio es la colaboración con la industria farmacéutica, una de cuyas líneas de investigación prioritaria va dirigida a la obtención de nuevos fármacos para el tratamiento de la disfuncionalidad vesical asociada al SM.

Los resultados del presente estudio se pretenden publicar en revistas incluídas en las bases de datos del *ISI* y en las que el grupo de investigación tiene experiencia previa de publicación como son: *British Journal of Pharmacology*, *American Journal of Physiology*, *Journal of Urology*, *Neurourology and Urodynamics*, etc. Además, tenemos previsto participar en los Congresos de la Grupo de Urología Funcional y Urodinámica de la Asociación Española de Urología, así como, de la *European Association of Urology*.

Medios disponibles para la realización del proyecto

El proyecto se llevará a cabo en el Laboratorio de Investigación de Músculo Liso de la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Dicho Laboratorio dispone de:

- Sistema multimiógrafo 820MS (*DMT, Danish MyoTechnology*) de órganos aislados conectado a un registrador de señal.
- Sistema miógrafo unicámara 310A (*DMT, Danish MyoTechnology*) para medida simultánea de tensión y $[Ca^{2+}]_i$.
- Microscopio de fluorescencia dicróico *Nikon K-92* (para FURA-2).
- Estimulador CS20 (*Cibertec*) y electrodos para estimulación eléctrica transmural.
- Lupa y fuente de luz acoplada para microdissección.
- Material de microdissección: placas, pinzas, tijeras etc.
- Microtomo de congelación.
- Espectrofotómetro.
- Módulo de electroforesis.
- Material de laboratorio de uso común (termostatos, balanzas, agitadores, neveras y congeladores).
- Sistema de adquisición y análisis de datos *PowerLab 8/35*.
- Ordenadores PC con software *GraphPad Prism* para la representación y análisis estadístico de los datos.

Justificación detallada de la ayuda solicitada

En relación con el material ya existente en nuestro laboratorio, se solicita como material inventariable, un fotómetro para microscopía de fluorescencia (FURA-2) *DeltaRam* con fotormultiplicador y lámpara de luz ultravioleta *RatioMaster (PTI, Microbeam)*. Dicho material nos permitirá ampliar los recursos existentes pudiendo realizar el protocolo experimental planteado en los plazos indicados. A la conclusión del presente proyecto, el aparataje solicitado pasará a formar parte de la infraestructura investigadora de la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la UCM.

Para la realización del protocolo experimental en sus diferentes abordajes metodológicos (inmunohistoquímica, *Western blot*, registro de tensión isométrica y medida simultánea de $[Ca^{2+}]_i$ y tensión), es indispensable la provisión de 84 ratas *Zucker* obesas (OZR) y sus correspondientes controles (*Zucker lean*, LZR), así como del siguiente material fungible: reactivos y *kits*, gases, material de microdisección (tijeras, pinzas, placas, etc), material de laboratorio (guantes, *ependorf*, papel de filtro, vidrio, etc..), material informático (tóner, antivirus, etc..), así como una partida dedicada al mantenimiento de equipos y gastos de gestión a cargo de la Fundación General de la UCM, cuyo coste ha sido calculado sobre la base de las anualidades de los diferentes proyectos de investigación desarrollados por nuestro grupo.

PRESUPUESTO SOLICITADO	
1. Gastos de personal	Euros
SUBTOTAL	0
2. Gastos de ejecución	
INVENTARIABLE: <ul style="list-style-type: none"> • 1 Fotómetro para fluorescencia <i>DeltaRam</i> con fotomultiplicador, lámpara de luz ultravioleta, monocromador y ocular <i>RatioMaster (PTI, Microbeam)</i>. 	38.000
FUNGIBLE: <ul style="list-style-type: none"> • 84 Ratas Zucker obesas (OZR) y sus correspondientes controles (LZR). • Reactivos y anticuerpos. • Gases. • Material de microdissección y laboratorio (Tijeras, pinzas, vidrio, etc..). • Material informático (tóner, antivirus, etc..). 	17.000 21.000 6.000 5.000 2.700
OTROS GASTOS: <ul style="list-style-type: none"> • Mantenimiento de equipos. • Gestión de la Fundación General de la UCM (5%). 	6.000 4.785
SUBTOTAL	100.485
Viajes y dietas	
<ul style="list-style-type: none"> • Asistencias a Congresos y Reuniones Científicas. 	3.300
SUBTOTAL	3.300
SUBTOTAL GASTOS EJECUCIÓN	103.785
TOTAL AYUDA SOLICITADA	103.785